

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Kati Kuld

**Potentsiaalsed haigustekitajad ja nende antibiootikumresistentsus tervete
inimeste mikrobiotas ning seos koduloomade pidamisega**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: MD, PhD Siiri Kõljalg

Kaasjuhendaja: MSc Jekaterina Jutkina

TARTU 2013

SISUKORD

| | |
|---|----|
| KASUTATUD LÜHENDID | 3 |
| SISSEJUHATUS | 4 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 5 |
| 1.1 Bakterid inimorganismis..... | 5 |
| 1.1.1 Bakterid kui inimese normaalse mikrobiota osa..... | 5 |
| 1.1.2 Bakterid kui infektsioonitekitajad..... | 5 |
| 1.1.3 Töös uuritavate bakterite lühiiseloostus | 6 |
| 1.1.4 Bakterite ülekanne inimeselt inimesele | 8 |
| 1.2 Inimesega kokkupuutuvate loomade mikrobiota | 9 |
| 1.2.1 Bakterite ülekanne loomadelt inimesele | 9 |
| 1.3 Antibiootikumid ja nende kasutamine, antibiootikumresistentsus | 12 |
| 1.3.1 Antibiootikumid ja nende toimemehhanismid..... | 12 |
| 1.3.2 Antibiootikumide kasutamine meditsiinis ja põllumajanduses | 13 |
| 1.3.3 Bakterite ravimresistentsus | 13 |
| 1.3.4 Inimese ja inimesega kokkupuutuvate loomade mikrobiota ravimresistentsus.... | 15 |
| 1.3.5 Resistentsusgeenide horisontaalne ülekanne | 15 |
| 2. EKSPERIMENTAALOSA | 17 |
| 2.1 Töö eesmärgid..... | 17 |
| 2.2 Materjal ja meetodika | 18 |
| 2.2.1 Uuritav materjal | 18 |
| 2.2.2 Mikrobioloogilised analüüsid | 18 |
| 2.2.3 Statistiline analüüs | 20 |
| 2.3 Tulemused ja arutelu..... | 21 |
| 2.3.1 Potentsiaalsete patogeenide esinemine uuritud inimeste mikrobiotas..... | 21 |
| 2.3.2 Antibiootikumresistentsete bakterite esinemine uuritud inimeste mikrobiotas.... | 25 |
| KOKKUVÕTE | 27 |
| SUMMARY | 28 |
| KIRJANDUSE LOETELU..... | 30 |
| KASUTATUD VEEBIAADRESSID | 34 |
| LISAD | 35 |
| TÄNUAVALDUSED..... | 38 |
| LIHTLITSENTS..... | 39 |

KASUTATUD LÜHENDID

APE – antimikroobse toime suurendaja (*Antimicrobial performance enhancers*)

ESBL – laiendatud toimespektriga beetalaktamaas (*Extended spectrum β -lactamase*)

EUCAST – antimikroobse tundlikkuse testimise Euroopa Komitee (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

MALDI – maatriksainega vahendatud laser desorptsioon ja ioniseerimine (*Matrix-assisted laser desorption ionization*)

MRSA – metitsilliinresistentne *Staphylococcus aureus* (*Methicillin-resistant S. aureus*)

MS – massispektromeetria

PBP – penitsilliiniga seonduv valk (*Penicillin-binding protein*)

PLS – *Partial Least Squares*

qPCR – kvantitatiivne PCR (*quantitative PCR*)

TOF – lennuaeg (*Time-of-Flight*)

VRE – vankomütsiinresistentne enterokokk (*Vancomycin-resistant enterococci*)

WHO – Maaailma Terviseorganisatsioon (*World Health Organization*)

XDR – resistentsus enamikele saadaolevatele antibiootikumidele (*Extensively drug-resistant*)

SISSEJUHATUS

Inimese normaalne mikrofloora ehk mikrobioota on organismide kooslus, mida leidub terve inimese nahal ja limaskestadel. Normaalses mikrobiootas on 10^{14} bakterirakku, rohkem kui 200 erinevast liigist. Mitmed normaalsesse mikrobiootasse kuuluvad bakterid võivad esineda patogeenide ehk infektsioonitekitajatena. Mikrobioota tähtsus seisneb seedeprotsessides ja ainevahetuses osalemises ning immuunsüsteemi stimuleerimises.

Käesolevas töös uuritakse lähemalt stafülokokke, enterokokke, enterobaktereid ja pseudomonaade. Kirjeldatakse bakterite ülekannet inimeselt inimesele ja loomadelt inimesele.

Antibiootikumide põhjendamatu, korduv ja ebaõige tarvitamine soodustab antibiootikumresistentsuse levikut. Suur hulk antibiootikume on kasutusel loomakasvatustes, ravimeid antakse loomadele nii terapeutilistel kui ka profülaktilistel eesmärkidel, antibiootikume lisatakse järjepidevalt ka loomasööta toidu efektiivsuse suurendamiseks. Kontrollimatu antibiootikumide tarvitamine aitab kaasa resistentsuse väljakujunemisele.

Bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida terve inimese mikrobioota koosseisu ning kuidas pidev kokkupuude koduloomadega seda mõjutab. Uuritakse potentsiaalsete patogeenide esinemist ja antibiootikumresistentsete bakterite levikut tervete inimeste mikrobiootas.

Töö on teostatud Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna mikrobioloogia instituudis ja SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlaboris.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Bakterid inimorganismis

Terve inimese veri, aju, lihased ja muud sisekoed on tavaliselt mikroobivabad. Kuna kattekoed on pidevas kontaktis ümbritseva keskkonnaga, siis need koloniseeritakse kergesti mitmete mikroobiliikide poolt (<http://textbookofbacteriology.net/normalflora.html>). Praeguseks on teada, et inimese keha on enne sündi täiesti steriilne ehk vaba kõigist mikroobidest. Esimesed bakterid saadakse sünnituse käigus (Reid jt., 2011; Dominguez-Bello jt., 2010). Organismi mikrobiota kujuneb välja teise ja neljanda eluaasta vahel. Inimesel, kellel on mikrobiota kujunemine imikuna olnud häiritud, suureneb infektsioonhaiguste oht (Mikelsaar jt., 2006). Eri bakteritüved panevad aluse immuunsüsteemile (Reid jt., 2011).

1.1.1 Bakterid kui inimese normaalse mikrobiota osa

Inimese normaalse mikrobiota ehk mikrofloora moodustavad organismid, mida leidub terve inimese nahal ja limaskestadel. Normaalse floora sisaldab mõningaid eukariootseid seeni ja protiste, kuid suurema osa mikroobidest moodustavad bakterid. Inimese mikrobiotat mõjutavad mitmed tegurid, nagu näiteks indiviidi geneetika, vanus, sugu, stress, toitumine ja keskkond, üks oluline faktor on ka antibiootikumide kasutamine. Normaalse mikrobiota sisaldab rohkem kui 200 eri bakteriliiki. On välja arvatud, et inimese suus on 10^{10} , nahal 10^{12} ja seedetraktis 10^{14} bakterit. Levinuimad bakterid on stafülokokid ja streptokokid, peensoole tuntuim bakter on *Escherichia coli* (<http://textbookofbacteriology.net/normalflora.html>). Mikrobiota kontrollib mitmeid elutähtsaid funktsioone nagu seedimisprotsessid ja ainevahetus, samuti on oluline immunoloogilise kaiste tekitamisel (Mikelsaar jt., 2006).

1.1.2 Bakterid kui infektsioonitekitajad

Mitmed mikroobid (näiteks *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) võivad esineda nii patogeenidena kui ka normaalse mikrobiota osana. Patogeenid ehk infektsioonitekitajad bakterid jaotatakse obligaatseteks ehk tõelisteks ja oportunistlikeks ehk tinglikeks. (i) Tõelised patogeenid on bakterid, mis tavaliselt ei esine normaalse mikrobiota koostises ning peremeesorganismi sattudes põhjustavad alati haigestumist. Infektsioon on väga nakkav, kui haigustekitajad tulevad väliskeskkonnast. Haiguse ärahoidmine ja ravimine on tavaliselt spetsiifiline põhinedes organismi võimel kutsuda esile antikehade teket. (ii) Oportunistliku patogeeni haigust tekitava toime ilmnemiseks on vajalik organismi kaitsevõime langemine. Sellised soodustavad tingimused on näiteks rasedus, menopaus,

diabeet, kasvajak, immuunpuudulikkus, ioniseeriv kiirgus, samuti on ohustatud vastsündinud ja eakad inimesed. Infektsiooni põhjustavad mikroobid on tavaliselt pärit organismi enda mikrobiotast (Mikelsaar jt., 2006).

Infektsioon tekib siis, kui bakterid, kaasa arvatud normaalsesse mikrobiotasse kuuluvad, tungivad organismi steriilsele pinnale. Eri bakteritel on erinev haiguse tekitamise võime. Haigestumist mõjutavad ka bakteri sisenemise tee, infektsioonitekitajate hulk ja mis kõige tähtsam, peremeesorganismi kaitsevõime (<http://textbookofbacteriology.net/NHPR.html>). Inimesel ja tema mikrobioomil on välja kujunenud mehhanismid kaitsmaks infektsioonide eest, aga ka taastamaks mikroobset homöostaasi (Reid jt., 2011).

1.1.3 Töös uuritavate bakterite lühiiseloost

Stafülokokid on gram-positiivsed kerajad bakterid, mis sageli esinevad viinamarja kobaraid meenutavate rühmadena. Stafülokokkidest on interaktsioonil inimesega olulised kaks liiki, need on *Staphylococcus aureus* ja *Staphylococcus epidermidis*. *Staphylococcus aureus* on kollase pigmendiga ning esineb enamasti ülemistel hingamisteedel, samuti nahal, suuõõnel ja seedetraktis. *Staphylococcus epidermidis* on pigmenditu, leidub tavaliselt nahal või limaskestal (<http://textbookofbacteriology.net/staph.html>, Madigan ja Martinko, 2006).

Viimase 10 aasta jooksul on tõusnud metitsilliinresistentse *Staphylococcus aureus*'e (MRSA, ingl k *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) (joonis 1) poolt põhjustatud infektsioonide arv. See antibiootikumresistentne stafülokokk on levinud üle kogu maailma. Nakatumise riskifaktoriteks on ebapiisav hügieen, lähedane kontakt nakatunud organismiga ning kahjustatud nahk. MRSA puhanguid on märgatud eelkõige haigla keskkonnaga kokkupuutuvate inimeste, narkootikumide kasutajate, atleetide ja vangide seas. Suureks probleemiks on MRSA tüvede võime põhjustada tõsiseid haigusi ka terve immuunsüsteemiga indiviididel (Kasper ja Fauci, 2010).



Joonis 1. Metitsilliinresistentne *Staphylococcus aureus* diferentsiaalsöötmel.

(<http://www.oxid.com/CA/blue/press/press.asp?art=Y&arch=Y&pRef=CADENIM07&c=CA&lang=EN&yr=2005>)

Enterokokkide perekonda kuuluvad bakterid on gram-positiivsed fakultatiivsed anaeroobid, esinevad nii üksikult, paarikaupa kui ka lühikeste ahelatena. Enterokokid on katalaas-negatiivsed ning madala virulentsusega. Nad on osa inimese soole normaalsest mikrobiotast, kuid võivad esile kutsuda kuseteede infektsiooni, baktereemiat ehk bakterite esinemist veres ja endokardiiti inimestel, kelle immuunsüsteem on häiritud. Koostöös teiste patogeenidega võivad põhjustada kõhuõõne- ja haavainfektsioone (Fisher ja Philips, 2009; Menichetti ja Tagliaferri, 2012). Põhilised inimesele patogeensed enterokokid on *Enterococcus faecalis* ja *Enterococcus faecium*. Need nakatavad eelkõige eakaid või neid, kelle limaskest või epiteel on antibiootikumide kasutamise tõttu häiritud. Paljudes haiglates on 1980ndate lõpust alates sagedasemaks muutunud vankomütsiinresistentsed enterokokid (VRE, ingl k *Vancomycin-resistant Enterococci*) (Kasper ja Fauci, 2010).

Enterobakterite sugukonda kuuluvad bakterid on kepikujulised, fakultatiivsed anaeroobid ja gram-negatiivsed. Nad elavad nii haigete kui ka tervete loomade soolestikus (<http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html>). Enterobakterid põhjustavad paljusid haigusi: alumiste hingamisteede-, naha-, pehme koe-, kõhuõõne-, kesknärvisüsteemi-, kuseteede- ja silmainfektsioone, baktereemiat, endokardiiti, septilist artriiti ja luupõletikku (Fraser jt., 2013). Enterobakterite poolt laiendatud toimespektriga beetalaktamaasi (ESBL, ingl k *Extended Spectrum β -Lactamase*) tootmine kujutab endast olulist meditsiinilist probleemi (<http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html>).

Pseudomonaadid on gram-negatiivsed kepikujulised bakterid, levinud eelkõige pinnases ja vees. Nad on tuntud taimepatogeenid, kuid neid leidub ka loomadel. Kliinilises tähtsuses on oluline *Pseudomonas aeruginosa* (joonis 2). See bakter on oportunistlik patogeen, mis tähendab, et ta põhjustab infektsiooni siis, kui peremeesorganismi kaitsevõime on vähenenud. *Pseudomonas aeruginosa* on looduslikult resistentne paljudele meditsiinis kasutuses olevatele antibiootikumidele. *Pseudomonas aeruginosa* on haigla keskkonnas laialt levinud ja võib kergesti patsiente nakatada põhjustades infektsioone kuse- ja hingamisteedes, pehmetes kudedes, luudes ja liigestes, seedetraktis; samuti erinevaid süsteemseid nakkusi, eriti patsientidel, kellel esineb immuunpuudulikkus. *Pseudomonas aeruginosa* infektsioon on tõsine probleem põletushaavade, tsüstilise fibroosi, AIDSi või vähiga patsientidel (Madigan ja Martinko, 2006; <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>).



Joonis 2. *Pseudomonas aeruginosa* kolooniad agaril

(<http://textbookofbacteriology.net/images/P.aeruginosa.colonies.jpg>)

1.1.4 Bakterite ülekannet inimeselt inimesele

Esimesed mikroobid satuvad inimorganismi sünnituse käigus ema sünnitusteedest. Järgnevate päevade jooksul lisandub mikroobe ema rinnapiimast, nahalt ja ka sünnitusmaja keskkonnast (Mikelsaar jt., 2006). Loomulikult viisil sündinud laste mikrobiota koosneb eelkõige ema vaginaalsest mikroobsest koosseisust, eesotsas *Lactobacillus* spp., *Prevotella* spp. ja *Sneathia* spp. Samas keisrilõikega ilmale toodud laste mikrobiota sarnaneb ema naha mikrobiotaga, näiteks *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. ja *Propionibacterium* spp (Reid jt., 2011; Dominguez-Bello jt., 2010).

Bakterite ülekannet võib toimuda kokkupuutel nakkusallikaga või eluta ja elusa looduse vahendusel (tabel 1) (Parm, 1995).

Tabel 1. Bakterite ülekande viisid

| Ülekande viis | Näide | Selgitus | Viide |
|--------------------------|---------|---|------------|
| Kontakt | Otsene | Naha (kätlemine, kallistamine) ja limaskestade (suudlemine) vahetu kokkupuutumine nakkusallikaga. | Parm, 1995 |
| | Kaudne | Nakatamine saastunud esemete kaudu (käterätikud, ukselindid, meditsiinitarvikud). | |
| Eluta looduse vahendusel | Õhk | Bakterid satuvad õhku piisknakkusena (köhimisel, aevastamisel, kõnelemisel) või tolmnakkusena (kuivamisele resistentsete bakterite kinnitumisel tolmuosakestele). | Parm, 1995 |
| | Toit | Toidus leiduvad mikroobid võivad pärineda kokkadelt, toidu pakendamise ja kaubandusega seotud inimestelt. | |
| | Vesi | Inimese või loomade väljaheidetega saastunud vee joomisel, nii levivad näiteks koolera ja tüüfus. | * |
| Elusa looduse vahendusel | Putukad | Malaaria levib inimeselt inimesele hallasääskede (<i>Anopheles maculipennis</i>) kaudu, kes kannavad ainurakset parasiiti (<i>Plasmodium falciparum</i>) | * |

* <http://www.microbiologyonline.org.uk/about-microbiology/microbes-and-the-human-body/routes-of-transmission>

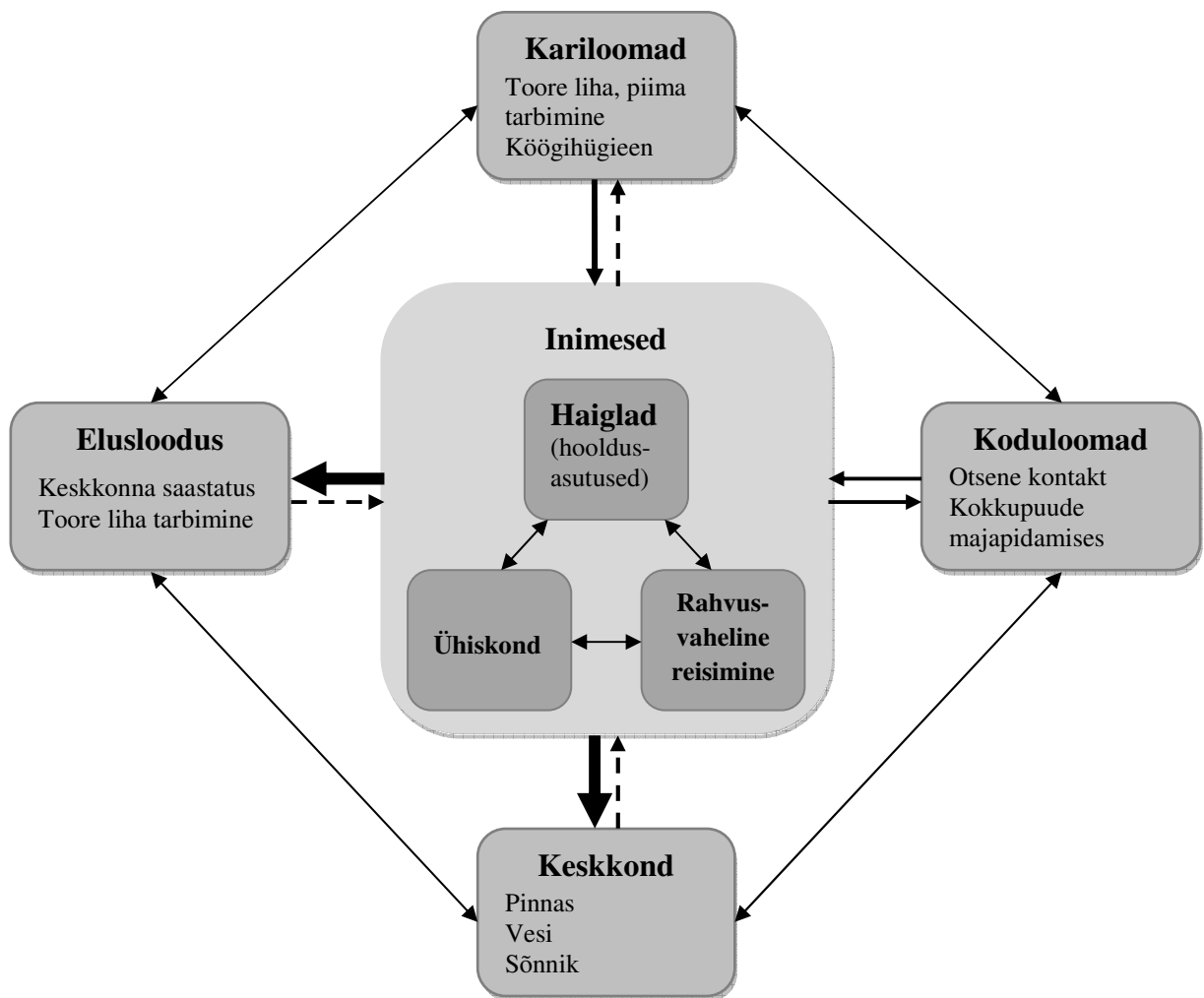
1.2 Inimesega kokkupuutuvate loomade mikrobiota

Koerte ja kasside seedetraktis olevad bakterid kuuluvad valdavalt rühmadesse *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* spp ja *Enterobacteriaceae* (Suchodolski, 2011). Koerte suu ja naha mikrobiota taksonoomiline mitmekesisus on oluliselt suurem võrreldes inimestega. Kui inimeste nahal domineerivad tavaliselt mõned taksonid (nimelt *Propionibacteriaceae*, *Streptococcaceae* ja *Staphylococcaceae*), siis koera käppadel ja otsaesisel leidub palju erinevaid taksoneid, mis on sageli leitud mitmete imetajate soolestikust (*Enterobacteriaceae*, *Fusobacteriaceae*), suust (*Porphyromonadaceae*, *Veillonellaceae*) ja nahalt (*Propionibacteriaceae*, *Staphylococcaceae*), aga ka pinnasest ja veest (*Hyphomicrobiaceae* ja *Sphingomonadaceae*) (Song jt., 2013).

2009. aastal läbi viidud uuringus võrreldi inimese ja taluloomade fekaalset mikrobiootat. Erinevused bakteripopulatsioonis tuvastati reaalaaja qPCR (ingl k *real-time quantitative PCR*) abil. Leiti, et *Bifidobacterium* perekonna arvukus erineb oluliselt hobuse, lehma, lamba ja sea mikrobiotas võrdluses inimesega. Sigade mikrobiootast leiti väiksem *E. coli* arvukus. *Streptococcus salivarius* oli enam levinud inimesel kui teistel loomadel. Ühelgi loomal ei tuvastatud enterokokkide liike. PLS regressioonanalüüs (inlg k *Partial Least Squares regression analysis*) näitas, et võrreldes teiste loomade ja inimestega on sea mikrobiotas kõrgem *Lactobacillus*'e, *Leuconostoc*'i ja *Pediococcus*'e populatsioon (Furet jt., 2009).

1.2.1 Bakterite ülekanne loomadelt inimesele

Bakterite ülekanne loomadelt inimesele võib toimuda otsese kontakti kaudu loomadega, aga ka läbi toidu, vee (bakterite sattumine põhjavette fekaalse reostuse tõttu (Sapkota jt., 2007)) ning loomsete jääkide. Joonisel 3 on näidatud antibiootikumresistentsete bakterite võimalikke ülekande teid ja võimalikku kokkupuudet erinevate elupaikadega. Suurendatud riskiga nakatuda on lähedase kontakti tõttu näiteks farmeritel, tapamaja töötajatel, loomaarstidel ja nendega tihedalt kokkupuutuvatel inimestel. Ülekanne võib olla kiirendatud geneetiliste elementide horisontaalsel ülekandel (Marshall ja Levy, 2011).



Joonis 3. Antibiootikumresistentsete bakterite ülekande teed (modifitseeritud: Ewers jt., 2012)

Esimesena kirjeldatud bakterite otsene levik loomadelt inimesele oli sama tetratsükliinresistentse *Echerichia coli* tüve leidmine nii kanala töötajate soole mikrobiotast kui ka kanadest, kes said tetratsükliinlisandiga toitu. Bakterite ülekande keerulisem tee on läbi toiduahela, bakterid ja nende geenid esinevad toidus ja loomsete produktide töötlemise igas etapis (Marshall ja Levy, 2011). Intensiivses loomakasvatuses on levinud toiduloomade asümptomaatilised *Salmonella* infektsioonid. Loomade tapmise käigus võib liha kontamineeruda soolestikus olevate salmonelladega. Inimene võib nakatuda süües saastunud liha, lihaprodukte või mune (Bogaard ja Stobberingh, 2000).

Euroopa Liidu maades on sageli avopartsiiini kasutatud kui APE (ingl k *antimicrobial performance enhancers*). See on viinud vankomütsiinresistentsete enterokokkide levikule. VRE leiti nii loomasöödast kui ka tervete inimeste soole mikrobiotast. Bakterite ülekannet tõestab asjaolu, et Rootsis ja Ameerika Ühendriikides, kus avopartsiiini ei ole kunagi kasutatud, ei ole leitud VRE suurenenud osakaalu toiduloomade või tervete inimeste soole mikrobiotas (Bogaard ja Stobberingh, 2000).

Koduloomade tavapärasest käitumist (genitaalide ja naha lakkumine, väljaheidetes püherdamine, koprofaagia) arvestades on ootuspärane, et nende karvastik, nahk ja suu kontamineeruvad väljaheites ja nahapinnal olevate bakteritega. Viimaste otsene ülekannet inimesele on nahk-nahk kontakt (loomade paitamine või muu vahetu kokkupuude), kaudne ülekannet võib toimuda mis tahes pindadelt, millega nii loomad kui inimesed majapidamises kokku puutuvad (Costa jt., 2013). Ebapiisava hügieeni korral on bakterite ülekannet loomadelt inimese mikrobiootasse eriti soodustatud.

Hiljutisest uuringust (Song jt., 2013) inimese mikrobioota sõltuvusest kokkupuutes koduloomadega selgus, et koeraomanike mikrobioota (eriti naha mikrobioota) on sarnasem üksteisele kui koera mitteomanikele inimestele. Partneritel, kes elasid koos koeraga, oli sarnasem mikrobioota kui neil, kes ei omanud koera. Mikroobikooslus oli sarnasem vanemate ja koera vahel kui vanemate ja laste vahel.

1.3 Antibiootikumid ja nende kasutamine, antibiootikumresistentsus

1.3.1 Antibiootikumid ja nende toimemehhanismid

Antibiootikumid on mikroorganismide poolt toodetud mikroobide kasvu pidurdavad või neid hävitavad ained. Antibiootikumide mõju on kas bakteriostaatiline ehk kasvu pidurdav või bakteritsiidne ehk baktereid surmav. Esimesena täheldas antibakteriaalset efekti Alexander Fleming 1928. aastal. Penitsilliini hakati tööstuslikult tootma 1940ndatel. Praeguseks on välja töötatud sadu erinevaid antibiootikume (Mikelsaar jt., 2006). Uute antibiootikumide tootmine on oluliselt vähenenud.

Toimemehhanismi järgi jaotatakse antibiootikumid nelja suuremasse rühma (tabel 2).

Tabel 2. Antibiootikumide jaotus toimemehhanismide järgi.

| Toimemehhanism | Selgitus | Näited | Viited |
|---------------------------------------|---|--|--|
| Bakteriraku seina sünteesi pidurdavad | Levinuim toimemehhanism. Rakuseina ühe tähtsaima komponendi peptidoglükaani süntees on pikk protsess, mistõttu on palju inhibeeritavaid etappe. | Glükopeptiidid, β -laktaamid: penitsilliinid, tsefalosporiinid, monobaktaamid, karbapeneemid, β -laktamaasi inhibiitorid | Mikelsaar jt., 2006; Kasper ja Fauci, 2010 |
| Valgusünteesi pidurdavad | Toime seisneb ribosoomide blokeerimises. | Aminoglükosiidid, tetratsükliinid, kloramfenikoolid | Mikelsaar jt., 2006; Kasper ja Fauci, 2010 |
| Nukleiinhappe sünteesi pidurdavad | Pärsivad kas DNA replikatsiooni või RNA polümeraasi | Kinoloonid, rifampitsilliin, nitroimidasoolid | Kasper ja Fauci, 2010 |
| Ainevahetust pärssivad | Pärsivad bakteri metaboolseid radu, sealhulgas ka nukleiinhapete sünteesiks vajalike prekursorite tootmist. | Sulfoonamiidid | Mikelsaar jt., 2006; Kasper ja Fauci, 2010 |

1.3.2 Antibiootikumide kasutamine meditsiinis ja põllumajanduses

Loodusest on tuvastatud suur hulk antibiootikume, kuid vähem kui üks protsent on meditsiiniliselt kasutatav. Siiski on antibiootikumide avastamine suurim 20. sajandi avastus, kuna nende abil on võimalik ravida infektsioonhaigusi, mis varem osutusid surmavaks. Paljud looduslikud antibiootikumid on struktuurselt modifitseeritud, et suurendada nende efektiivsust (semisünteetilised antibiootikumid) (Madigan ja Martinko, 2006).

Igal aastal sureb Euroopa Liidus 25000 inimest antibiootikumresistentse bakteri poolt tekitatud infektsiooni tõttu (WHO Europe, 2011). Antibiootikumresistentsed infektsioonid on raskesti ravitavad või ravile üldse allumatud, ravi kestus on pikem ning kulutused kõrgemad (Karlowsky jt., 2004).

Ameerika Ühendriikides kasutusel olevatest antibiootikumidest 70% antakse loomadele (mitteterapeutilistel eesmärkidel) (<http://www.keepantibioticsworking.com/library/UploadedFiles/ABR-UCS-fact-sheet.pdf>).

Antibiootikume kasutatakse veterinaarsetel näidustustel bakteriaalsete infektsioonide profülaktikas (ennetuses), metafülaktikas (eelravis) ja teraapias ehk kindlate näidustuste ravimisel (Schwarz jt., 2001). Neid lisatakse järjepidevalt ka loomasöötmesse, et suurendada toidu efektiivsust ja vähendada jäätmete tootmist. Sellisel eesmärgil kasutatavaid antibiootikume kutsutakse toidusäätjateks või antimikroobse toime suurendajateks (APE). Euroopas moodustavad APED ligikaudu 30% kõikidest loomadel kasutatavatest antibiootikumidest. Euroopas on olemas seadus, mis keelab kasutada nn toidusäätjana selliseid antibiootikume, mis on kasutusel inimeste või loomade ravil (Bogaard ja Stobberingh, 2000).

1.3.3 Bakterite ravimresistentsus

Antimikroobne ravimresistentsus on mikroorganismide omandatud vastupanuvõime kemoterapeutilistele ainetele. Resistentsus kujunes välja antibiootikume tootvate mikroorganismide poolt, et neutraliseerida enda poolt toodetud antibiootikumide kahjustavat toimet. Kahjuks võivad resistentsust kodeerivad geenid üle kanduda ka teistesse mikroorganismidesse. Antibiootiline resistentsus võib olla geneetiliselt kodeeritud kromosomaalsel või plasmiidisel tasandil ning võib tekkida geenide ülekandel ühest bakterist teise või spontaanse mutatsiooni läbi bakteri DNAs. On mitmeid meetodeid, kuidas mikroobid on omandanud antibiootikumresistentsuse (Madigan ja Martinko, 2006; <http://www.abc.net.au/science/slab/antibiotics/resistance.htm>).

1. Kinnitusstruktuuri puudumine. Mükoplasma on resistentsed penitsilliinile, kuna neil puudub bakteritele tüüpiline rakusein (Madigan ja Martinko, 2006). Geneetiline muutus võib eemaldada ka teatud valgu, mistõttu antibiootikum ei saa kinnituda ja toimet ei oma (<http://www.abc.net.au/science/slab/antibiotics/resistance.htm>).
2. Rakuseina permeaablus. Enamik gram-negatiivsetest bakteritest on läbipääsmatud bensüülpenitsilliinile (Madigan ja Martinko, 2006).
3. Antibiootikumide muutmine inaktiivsesse vormi. Paljud stafülokokid sisaldavad β -laktamaase, mis lõhuvad enamike penitsilliinide β -laktaamringi (Madigan ja Martinko, 2006).
4. Antibiootikumide sihtmärgi muutmine (Madigan ja Martinko, 2006). Mutatsioon sihtmärkvalgus võib ära hoida antibiootikumi seondumise (<http://www.abc.net.au/science/slab/antibiotics/resistance.htm>).
5. Resistentne biokeemiline rada (Madigan ja Martinko, 2006). Bakter võib toota konkreetseid ensüüme, mis inaktiveerivad antibiootikume (<http://www.abc.net.au/science/slab/antibiotics/resistance.htm>).
6. Efluks ehk antibiootikumide väljapumpamine rakust (Madigan ja Martinko, 2006).

Staphylococcus aureus'e metitsilliin-resistentsus (MRSA) on põhjustatud penitsilliiniga seonduvate modifitseeritud valkude (PBP2a) poolt, mis ei ole inhibeeritav ühegi beeta-laktaami poolt (Menichetti ja Tagliaferri, 2012).

Enterokokid on looduslikult resistentsed tsefalosporiinidele. Nad suudavad omandada geneetilisi elemente, mis annavad resistentsuse penitsilliinidele, aminoglükosiididele ja glükopeptiididele. Levinuim on VRE ehk vankomütsiiniresistentne enterokokk. (Vankomütsiin kuulub glükopeptiidantibiootikumide rühma) (Menichetti ja Tagliaferri, 2012).

Resistentsus enterobakterite seas on põhjustatud laiendatud toimespektriga beetalaktamaasi (ESBL) või AmpC ensüümi tootmise poolt. ESBL ja AmpC on valgud, mille esinemise korral ei toimi tsefalosporiinid (Menichetti ja Tagliaferri, 2012).

Pseudomonas aeruginosa resistentsuse tagavad R-plasmiidid, mis kannavad endas antibiootikumresistentsust kodeerivaid geene (Madigan ja Martinko, 2006). XDR (ingl k *extensively drug-resistant*) *Pseudomonas aeruginosa* on resistentne karbapeneemidele, beetalaktaamidele, fluorokinoloonidele ja sageli ka aminoglükosiididele. (XDR viitab tüvedele, mis on resistentsed enamikele saadaolevatele antibiootikumidele) (Menichetti ja Tagliaferri, 2012).

1.3.4 Inimese ja inimesega kokkupuutuvate loomade mikrobiota ravimresistentsus

Antibiootikumide kasutamine suurendab endogeense mikrobiota resistentsust. Resistentsus võib kujuneda liigse antibiootikumide tarbimise tagajärjel aga ka resistentsete bakterite ülekandel kas teistelt inimestelt, loomadelt või keskkonnast (Bogaard ja Stobberingh, 2000). Resistentsete bakterite levikut suurendab asjaolu, et loomade infektsioonide ravil kasutatavaid antibiootikume tarbitavad ka inimesed (Schwarz jt., 2001).

Inimese mikrobiotasse kuuluvad bakterid mitte ainult ei põhjusta infektsiooni immuunpuudulikel patsientidel, vaid on olulised resistentsusgeenide hoidlad. Mõned mikroorganismid on nii multiresistentsed, et neid on väga raske või isegi võimatu ravida olemasolevate antibiootikumidega (Bogaard ja Stobberingh, 2000).

Antibiootikumide kasutamine veterinaarias puhtalt profülaktilistel eesmärkidel toob pikas perspektiivis rohkem kahju kui kasu. Paljud erinevad uuringud näitavad, et antibiootikumide kasutamise tõttu tekib loomade mikrobiotas antibiootikumresistentsus nagu inimestelgi. Mõned bakterid loomade mikrobiotas (enamik enterobaktereid, stafülokokke ja *Pasteurella* spp) saavutavad resistentsuse teatud antibiootikumide suhtes kergemini kui teised bakterid (streptokokid ja *Clostridium* spp). Kuna loomakasvatuses lisatakse antibiootikume profülaktilisel eesmärgil loomasööta ja joogiveesse, siis iga isendi ravimikogus ei ole eraldi kontrollitud, mistõttu on resistentsuse välja kujunemine lihtsustatud (Bogaard ja Stobberingh, 2000).

1.3.5 Resistentsusgeenide horisontaalne ülekanne

Kus iganes antibiootikume kasutatakse, bakterid arendavad alati välja resistentsusmehhanismid, kas läbi spontaansete mutatsioonide või omandades resistentsusgeene teistest bakteritest (geenide lateraalsel ehk horisontaalsel ülekandel). Horisontaalne geeniülekanne on geneetilise materjali ülekanne organismide vahel, selle all ei ole mõeldud geenide pärandumist vanematelt järglastele. Antibiootikumresistentsust määravate geenide levik on üheks parimaks näiteks horisontaalse geeniülekande esinemise kohta (Costa jt., 2013).

Prokariotides on kolm horisontaalse geeniülekande mehhanismi: transformatsioon, transduktsioon ja konjugatsioon. Transformatsioonil siseneb DNA rakku väliskeskkonnast (lüüsunud bakteri vaba DNA). Konjugatsioonil on vajalik rakk-rakk kokkupuude (plasmiidide

ja transposoonide ülekanne), transduktsioon on aga bakteriofaagide poolt vahendatud (Costa jt., 2013).

Mitmed katsed on näidanud geenide ülekannet. Lester ja teised (2006) täheldasid inimese seedetraktis vankomütsiinresistentsuse ülekandumist *Enterococcus*'e liikide vahel. Tuohy ja teiste (2002) poolt läbi viidud inimese mikrobiotaga seotud roti mudel näitas, et laia peremeesringiga plasmiid pAM β 1 võib üle kanduda *Lactococcus lactis* bakterilt *Enterococcus* bakteri liikidele, kusjuures ülekannet ei märgatud laktobatsillide, bifido- ja enterobakterite liikidele. Bidet ja teised (2005) tuvastasid ACC-1 AmpC (ESBL) ülekande bakteritüvelt *Klebsiella pneumoniae* bakteritüvele *Escherichia coli* üheaastase poisi antibiootikumkuuri ajal. Cavaco ja teised (2008) isoleerisid sigadelt bla_{CTX-M} ESBL geeni sisaldava indigeense *Escherichia coli* tüved. Tsefalosporiinravi ajal tõusis bla_{CTX-M} geene sisaldavate *Escherichia coli* tüvede mitmekesisus. Kõik need uuringud tõestavad resistentsusgeenide horisontaalse geeniülekande nähtust.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida terve inimese mikrobiota liigilist koosseisu ning kuidas pidev kokkupuude koduloomadega (koerad, sead) seda mõjutab. Selleks püstitati järgmised eesmärgid:

- 1) potentsiaalsete patogeenide ja
- 2) antibiootikumresistentsete bakterite leidmine uuritud inimeste mikrobiotast.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Uuritav materjal

Käesoleva töö uuringumaterjal koguti projekti Antibiootikumresistentsuse levikuteed (ABRESIST) raames Tartu Ülikooli, Eesti Maaülikooli ja Tartu Ülikooli Kliinikumi koostöös ajavahemikul mai – detsember 2012. Töös on kokku uuritud 284 inimese andmeid. Uuringuks saadi luba Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetika Komiteelt (nr 213/T-11).

Uuritavad jagati kolme gruppi vastavalt kokkupuutele koduloomadega (Tabel 3).

Tabel 3. Uuritav materjal

| Nr | Grupp | Inimeste arv | Mikrobioloogilised külvid | |
|-------|------------------|--------------|---------------------------|-----|
| | | | Nina | Roe |
| I | Ilma koduloomata | 32 | 18 | 12 |
| II | Koeraomanikud | 223 | 159 | 97 |
| III | Sigalatöötajad | 29 | 29 | 29 |
| Kokku | | 284 | 206 | 138 |

Mikrobioloogiliseks uuringuks koguti uuritavatelt vatitampooniga ninakaabe (n=206) potentsiaalsete patogeenide esinemise, antibiootikumresistentsete mikroobide (MRSA, VRE, ESBL) ning *Pseudomonas aeruginosa* leidmiseks ja roojaproov (n=138) antibiootikumresistentsete mikroobide ning *Pseudomonas aeruginosa* leidmiseks. Peale kogumist proovid külmutati ning säilitati -80°C juures edaspidisteks uuringuteks.

2.2.2 Mikrobioloogilised analüüsid

Külmutatud proovid sulatati toatemperatuuril ja külvati mitteselektiivsele veriagarile (ninakülvid) ning neljale diferentsiaaldiagnostilisele söötmele (nina- ja roojakülvid) (söötmete koostis vt. lisa 1).

- 1) *Brilliance*TM ESBL Agar (Oxoid) on kromogenne sööde laiendatud toimespektriga beetalaktamaasi tootvate organismide detekteerimiseks. See sööde võimaldab otse kliinilisest proovist 24 tunniga identifitseerida ESBL-tootva *Escherichia coli* ning *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* ja *Citrobacter* perekonda kuuluvad bakterid.
- 2) *Brilliance*TM MRSA (Oxoid) on kromogenne sööde MRSA identifitseerimiseks.
- 3) *Brilliance*TM VRE (Oxoid) on kromogenne sööde VRE identifitseerimiseks otse kliinilisest proovist 24 tunniga.
- 4) *Pseudomonas isolation agar* (Sigma-Aldrich) on selektiiv- ja diferentsiaalsööde esmaseks *Pseudomonas*'e isoleerimiseks ja identifitseerimiseks.

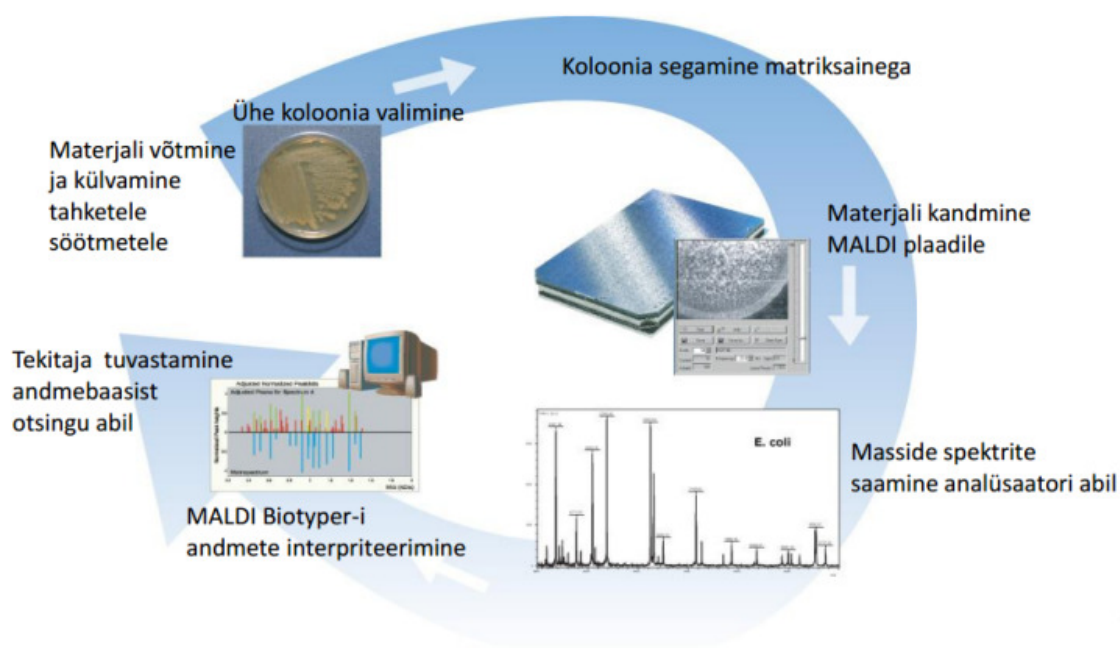
Söötmeid inkubeeriti seejärel 37°C termostaadis 24-48 tundi. Puhaskultuuri saamiseks ja mikroobide samastamiseks isoleeriti erineva morfoloogiaga pesad külvinõelaga veriagari sektorisse. Ninakülvidest otsiti erineva morfoloogiaga (1-2) domineerivaid gram-positiivsete bakterite kolooniaid ja kõiki gram-negatiivseid baktereid.

Bakterite esmaseks samastamiseks kasutati iseloomulikku kasvu diferentsiaaldiagnostilisel söötmel (vt lisa 1).

Bakterite lõplik tuvastamine toimus massispektromeetria (MS) abil. MS on füüsikaliskeemiline analüüsi meetod, mis põhineb aine molekulide ioniseerimisel ja saadud ionide mass-laengu registreerimisel mass-spektrite saamiseks. Ainete ioniseerimise üheks võimaluseks on maatriksainega vahendatud laser-ioniseerimine ja desorptsioon (MALDI, ingl k *Matrix-assisted laser desorption ionization*). Mass-laengu kindlakstegemiseks registreeritakse iooni lennuaeg (TOF, ingl k *Time-of-Flight*). Kokkuvõtlikult on MALDI-TOF kiire, spetsiifiline, tundlik ja odav (aparatuuri olemasolul) võimalus mikroobide identifitseerimiseks (<http://www.elmy.ee/public/files/MALDI-TOF%20Mikrobioloogias%20-%2008-12-2011.pdf>).

MALDI-TOF teostati *BrukerDaltonik MALDI Biotyper* masina abil Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlaboris. Saadud tulemuste alusel tekib spektrogramm, nõ piikide muster, mis vastab mikroorganismi proteoomile ehk valkude spektrile. Piikide kombinatsioon on igale organismile spetsiifiline, mistõttu on võimalik referents-andmebaasi olemasolul identifitseerida baktereid liigi tasandil (<http://www.elmy.ee/public/files/MALDI-TOF%20Mikrobioloogias%20-%2008-12-2011.pdf>).

Ühest bakterikolooniast võeti puutikuga materjal ja kanti spetsiaalsele plaadile, üks plaat mahutas 96 proovi. Lisati 1 µl hapet (HCCA, ingl k *alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid*), mis oli oluline bakterite lüüsiks, ja lasti kuivada toatemperatuuril. Seejärel lisati 1 µl maatriksainet. Pärast kuivamist asetati plaat masinasse. Kokkuvõttev skeem on toodud joonisel 4 (autor lisas kõigepealt happe ja seejärel maatriksaine).



Joonis 4. MALDI-TOF identifitseerimine (<http://www.elmy.ee/public/files/MALDI-TOF%20Mikrobioloogias%20-%202008-12-2011.pdf>).

Kaastöötajad teostasid täiendavad E-testid (AB Biodisk) MRSA ja VRE kindlakstegemiseks. Vastavalt EUCASTi normidele on MRSA korral oksatsilliini minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$, VRE korral on vankomütsiini minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon >4 $\mu\text{g/ml}$ (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v1.3_pdf.pdf).

2.2.3 Statistiline analüüs

Statistiliseks analüüsiks kasutati arvutiprogrammi Microsoft Office Excel 2010 ja SigmaStat versiooni 2.0. Gruppide võrdluses kasutati Fisher Exact testi ja χ^2 -testi olulisusnivooga $p < 0,05$.

2.3 Tulemused ja arutelu

Kokku uuriti 284 inimese mikrobioloogilisi külve. I grupis (koduloomata) oli 32, II grupis (koeraomanikud) 223 ja III grupis (sigala töötajad) 29 inimest. Kokku teostati 336 mikrobioloogilist külvi (ninast 206 ja roojast 138) ning isoleeriti 235 mikroobitüve (ninast 223 ja roojast 12).

2.3.1 Potentsiaalsete patogeenide esinemine uuritud inimeste mikrobiotas

Ninakülvidest (n=206) otsiti domineerivaid gram-positiivseid baktereid ja kõiki gram-negatiivseid baktereid, leiti 45 erinevat bakteriliiki (vt tabel 4 ja lisa 2). Kolmandikust sigala töötajate ninakülvidest (9/29) leiti kaks või enam bakteriliiki. Loomadega mittekokkupuutuvatel inimestel leiti kaks või enam bakterit 2/18 juhul, koeraomanikel 13/159 juhul. Mikroobe leiti kokku 197/206 (96%) inimese ninakülvist.

Kõige sagedamini leiti gram-positiivseid baktereid (171/206; 77%). Mikroobiliikidest esines kõige rohkem *Staphylococcus epidermidis* (102/206; 46%), millele järgnes *Staphylococcus aureus* (39/206; 18%). *Staphylococcus epidermidis* kui kommensaalne bakter kuulub terve inimese mikrobiotasse, sellel bakteril on küll madal tõestamisvõime, kuid viimastel aastakümnetel on mõned tüved muutunud suure kohanemisvõimega patogeenideks. Juba 1980ndatest on need tüved ühed olulisemad haiglanakkuste põhjustajad. Peamine *Staphylococcus epidermidis*'e patogeensusfaktor arvatakse olevat biofilmi moodustamine (Liduma jt, 2012). Pikaajalised uuringud on näidanud, et *Staphylococcus aureus* esineb keskmiselt 20% inimeste ninas püsivalt (Wertheim jt., 2005). *Staphylococcus aureus* on patogeensem bakter koagulaas-positiivsete liikide seast, põhjustab näiteks nahainfektsioone, sinusiiti, kopsu- ja südame sisekesta põletikku (Ziebuhr, 2001).

Gram-negatiivseid baktereid leiti 25% (52/206) proovidest. Sagedaseimad bakterid olid *Escherichia coli* (3%) ja *Proteus mirabilis* (2%). *Escherichia coli* on väga levinud jämesoolebakter ning üks sagedaseim bakteriaalse infektsiooni põhjustaja. Võib tekitada kuseteede haigusi, baktereemiat, sapipõiepõletikku, sinusiiti, kopsupõletikku, kõhulahtisust (Madappa ja Go, 2012). Proteuse liigid põhjustavad enamasti kuseteede infektsioone, kuid neid on kirjeldatud ka ülemiste hingamisteede haiguste oportunistidena (Jacobsen, 2011). Proteuse infektsioonidest 90% on tekitatud *Proteus mirabilis*'e poolt (Struble jt., 2013).

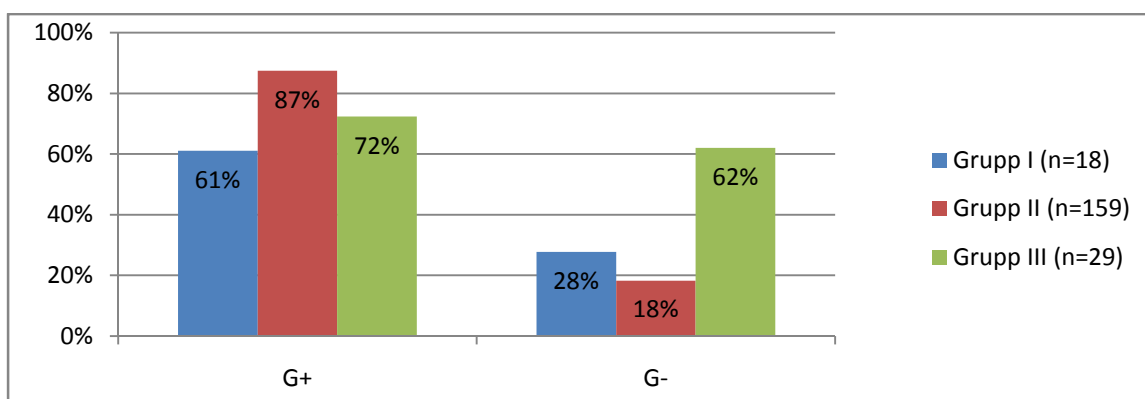
Uuringutest on selgunud, et tervete inimeste ninaesikus on ülekaalus propioonibakterid, korünebakterid ja stafülokokid (Oh jt., 2012; Wos-Oxley jt., 2010).

Tabel 4. Mikroobiliikide esinemine tervete inimeste ninakülvides. (Grupp I – koduloomata inimesed, grupp II – koeraomanikud, grupp III – sigalatöötajad).

| Mikroob | | Inimeste arv, kellel ninakülv tehti | | | |
|------------------|---|-------------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| | | Kokku n=206 | Grupp I n=18 | Grupp II n=159 | Grupp III n=29 |
| Gram(+) bakterid | <i>Staphylococcus aureus</i> | 39 | 2 | 34 | 3 |
| | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 102 | 6 | 82 | 14 |
| | Teised koagulaas-neg. stafülokokid* | 20 | 2 | 14 | 4 |
| | <i>Bacillus pumilus</i> | 1 | | 1 | |
| | <i>Bacillus weihenstephanensis</i> | 1 | | 1 | |
| | <i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> | 4 | | 4 | |
| | <i>Corynebacterium propinquum</i> | 1 | | 1 | |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | | |
| | <i>Micrococcus luteus</i> | 2 | | 2 | |
| | Gram(+) bakterid kokku | 171 | 11 | 139 | 21 |
| Gram(-) bakterid | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 1 | | | 1 |
| | <i>Acinetobacter johnsonii</i> | 2 | | 1 | 1 |
| | <i>Acinetobacter lwoffii</i> | 3 | 1 | 1 | 1 |
| | <i>Acinetobacter pittii</i> | 3 | 1 | 2 | |
| | <i>Acinetobacter ursingii</i> | 1 | | 1 | |
| | <i>Aeromonas media</i> | 1 | | | 1 |
| | <i>Chryseobacterium gleum</i> | 1 | 1 | | |
| | <i>Citrobacter freundii</i> | 2 | | 1 | 1 |
| | <i>Citrobacter koseri</i> | 4 | | 4 | |
| | <i>Citrobacter murlinae</i> | 1 | | 1 | |
| | <i>Enterobacter aerogenes</i> | 1 | | 1 | |
| | <i>Enterobacter cloacae</i> | 1 | | 1 | |
| | <i>Erwinia persicina</i> | 1 | | | 1 |
| | <i>Escherichia coli</i> | 7 | | 5 | 2 |
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 3 | | 1 | 2 |
| | <i>Moraxella catarrhalis</i> | 3 | 1 | 1 | 1 |
| | <i>Moraxella_sg_Moraxellacanis</i> | 1 | | 1 | |
| | <i>Myroides odoratimimus</i> | 1 | | | 1 |
| | <i>Neisseria zoodegmatis</i> | 1 | | 1 | |
| | <i>Pantoea agglomerans</i> | 1 | | 1 | |
| | <i>Pantoea calida</i> | 1 | | 1 | |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | 5 | | 3 | 2 |
| | <i>Proteus vulgaris</i> | 2 | | | 2 |
| | <i>Providencia rustigianii</i> | 1 | | | 1 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | | 1 | |
| | <i>Raoultella ornithinolytica</i> | 2 | 1 | 1 | |
| | <i>Raoultella planticola</i> | 1 | | | 1 |
| | Gram(-) bakterid kokku | 52 | 5 | 29 | 18 |
| Mikroobe kokku | | 223 | 16 | 168 | 39 |

* Teised koagulaas-negatiivsed stafülokokid: *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. pseudointermedius*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. warneri* ja *S. xylosus*.

Joonisel 5 on näidatud gram-positiivsete ja gram-negatiivsete bakterite esinemissagedus erinevates uuringugruppides. Loomadega kokkupuutuvatel inimestel leiti sagedamini gram-positiivseid mikroobe kui loomadega mittekokkupuutuvatel inimestel (vastavalt 160/188 vs 11/18; $p=0,024$). Gram-positiivseid baktereid esines kõige enam koeraomanikel (139/159; 87%), mis oli oluliselt rohkem, kui koduloomata inimestel (11/18; 61%; $p=0,009$). Gram-positiivsed stafülokokid on levinud koerte mikrobiotas (Malik jt., 2007). Töös saadud tulemusi võib seostada koerte mikrobiotasse kuuluvate gram-positiivsete bakterite võimaliku ülekandega inimesele ehk kooselu koeraga võib muuta inimese mikrobiotat, mida on näidanud ka Song ja kaastöötajad (2013).



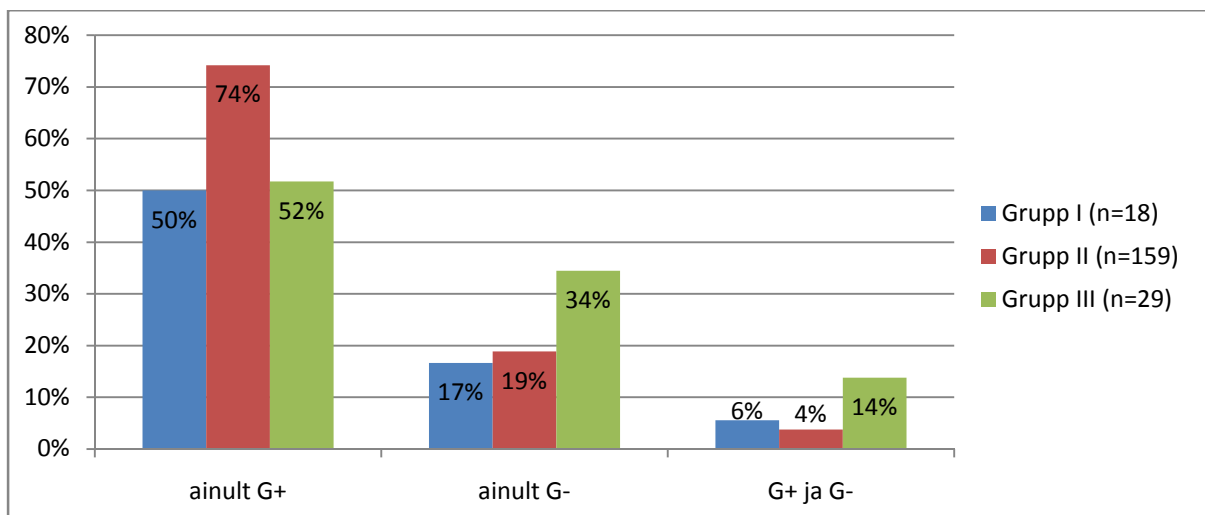
Joonis 5. Gram-positiivsete ja gram-negatiivsete mikroobide esinemissagedus ninakülvides. (Grupp I – koduloomata inimesed, grupp II – koeraomanikud, grupp III – sigala töötajad).

Gram-negatiivseid baktereid leiti 62% (18/29) sigala töötajatest (joonis 5). Loomadega mittekokkupuutuvatel inimestel ja koeraomanikel leiti gram-negatiivseid baktereid oluliselt vähem, kui sigalatöötajatel (vastavalt 5/18 vs 18/29; $p=0.036$ ja 29/159 vs 18/29; $p < 0,001$). Mitmed uuringud on leidnud, et farmi keskkond kujutab endast gram-negatiivsete bakterite allikat, mis tekitavad märkimisväärt ohtu haigestuda hingamisteede haigustesse (Hašina jt., 2009; Heederik jt., 1991). Sigala õhus esinevad sageli gram-negatiivsete bakterite (*Escherichia coli*, *Neisseria* sp., *Pseudomonas* sp.) välimises rakumembraanis olevad endotoksiinid, mille sissehingamine võib tekitada kopsu põletikulisi reaktsioone (Hašina jt., 2009).

Ainult gram-positiivseid baktereid leiti 142/206 (69%), ainult gram-negatiivseid baktereid 43/206 (21%) ning üheaegselt nii gram-positiivseid kui gram-negatiivseid baktereid 11/206 (5%) uuritud inimestest. Kultiveeritavaid mikroobe ei tuvastatud 9/206 (4%) proovidest, see tähendab, et mikroobide arv jäi allapoole antud testi tundlikkuse piire. Uuringu tundlikkust oleks võimalik tõsta rikastussöötmete kasutamisega. Oluliselt rohkem leiti kasvuta ninakülve

ilma loomata inimestel võrreldes loomadega kokkupuutuvate inimestega (5/18 vs 4/188; $p < 0.001$).

Joonisel 6 on näidatud ninakülvide mikrobioloogilise uuringu tulemused gruppide kaupa. Ainult gram-positiivseid baktereid leiti sagedamini koeraomanikel kui sigalatöötajatel (118/159 vs 15/29; $p = 0,026$). Ainult gram-negatiivsete bakterite ning nii gram-positiivsete kui gram-negatiivsete bakterite esinemises ühes proovis ei leitud gruppidevahelisi statistilisi erinevusi.



Joonis 6. Ninakülvide mikrobioloogilise uuringu tulemused. (Grupp I – koduloomata inimesed, grupp II – koeraomanikud, grupp III – sigala töötajad).

Roojaproovidest (tabel 5) leiti *Pseudomonas aeruginosa* kokku kolmel (esinemissagedus 2,2%), ninaproovidest (tabel 4) ühel juhul (esinemissagedus 1%). Kõigil juhtudel oli tegemist loomadega kokkupuutuvate inimestega (koeraomanikega).

Tabel 5. Antibiootikumresistentsete mikroobide ja *Pseudomonas aeruginosa* esinemine tervete inimeste roojas. (Grupp I – koduloomata inimesed, grupp II – koeraomanikud, grupp III – sigala töötajad).

| Mikroob | Inimeste arv, kellel leiti antud mikroob | | | |
|--|--|---------|----------|-----------|
| | Kokku | Grupp I | Grupp II | Grupp III |
| | n=139 | n=13 | n=97 | n=29 |
| Metitsillin-resistentne <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Vankomütsiin-resistentsete enterokokid | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ESBL tootvad enterobakterid | 8 | 1 | 2 | 5 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 3 | 0 | 3 | 0 |

Pseudomonas aeruginosa ei esine sageli inimese roojas (Koh jt., 2005). Paljudele erinevatele oelmasolevatele antibiootikumidele vaatamata on *Pseudomonas aeruginosa* üks peamisi haiglanakkuste põhjustaja. See on põhjustatud *Pseudomonas aeruginosa* sagedasest resistentsusest paljudele antibiootikumidele ja antimikroobidele (osaliselt tänu efektiivsele efluks- ehk väljapumpamissüsteemile) (Saedi jt., 2011).

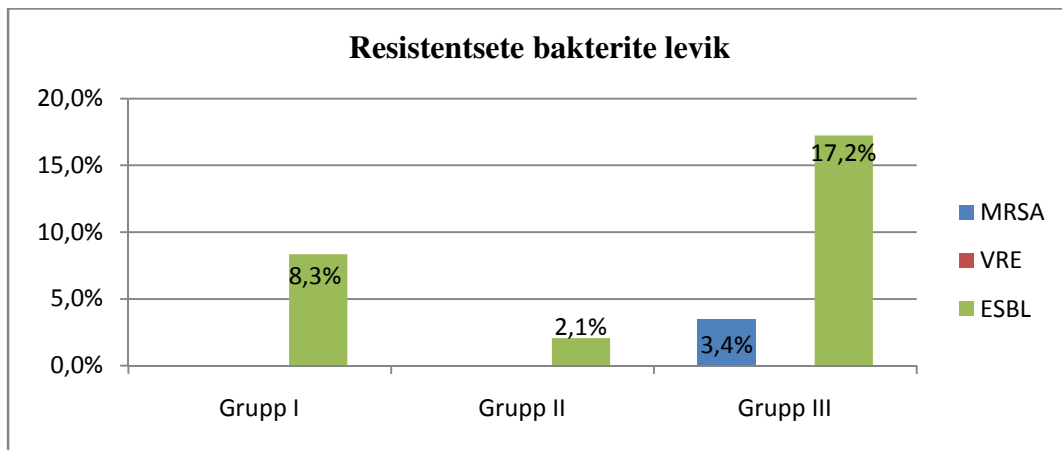
Kuigi konsensusale ei ole jõutud, on mitmed teadustööd näidanud pöördvõrdelist seost varajastel eluaastatel lemmikloomadega kokkupuutumise ja allergiliste haiguste vahel. Azad ja kaastöötajad (2013) leidsid, et kokkupuude lemmikloomadega varajases elueas võib mõjutada väikelapse üldist mikrobiota mitmekesisust ja koostist. Ege ja kaastöötajad (2012) järeldasid, et mitmekesisuses mikroobses keskkonnas võivad kindlad bakterid olla pidurdavaks asjaoluks astma ja atopia väljakujunemisel. Üldiselt on mikrobiota mitmekesisus inimesele kasulik, tagades nii-öelda kaitsva barjääri organismi ja keskkonna vahel.

2.3.2 Antibiootikumresistentsete bakterite esinemine uuritud inimeste mikrobiotas

Ninakülvidest (n=206) leiti resistentseid baktereid kahel loomadega kokkupuutuval inimesel. Ühel koeraomanikul MRSA ja VRE ning ühel sigalatöötajal MRSA.

Roojaproovides (n=138) tuvastati antibiootikumresistentseid baktereid (MRSA ja ESBL tootvad enterobakterid) kokku 9/138 juhul (tabel 5). See tähendab, et resistentseid bakteritüvesid leiti 6,5% uuritutest. Kõige enam leiti resistentseid tüvesid sigala töötajatel (6/29; 21%), seejärel kahel juhul koeraomanikel (2/97; 2%) ning ühel juhul (1/12; 8%) loomadega mittekokkupuutuval inimesel. Sigala töötajatel esines roojas statistiliselt rohkem resistentseid mikroobe kui koeraomanikel (6/29 vs 2/97; $p=0.001$).

Sigala töötajate hulgas oli antibiootikumresistentsete bakterite sagedus kokku 21% (joonis 7), mis tähendab, et igal viiendal töötajal leidis mõni resistentne bakteritüvi. Sigalas kasutatakse antibiootikume järjepidevalt, neid lisatakse loomasööta toidu paremaks säilimiseks ja bakteriaalsete haiguste ennetamiseks, iga isendi poolt tarvitatud antibiootikumide kogus ei ole kontrollitud, mistõttu on bakterite resistentsuse väljakujunemine soodustatud. Resistentseid bakterid võivad üle kanduda loomadelt töötajatele kontaktnakkusena (otsesel kokkupuutel sigadega, hoolimatul jalanõude/riiete vahetamisel), õhu kaudu (Chapin jt., 2005) või näiteks kärbest vahendusel. See võib olla põhjuseks, miks leiti kõige enam antibiootikumresistentseid bakteritüvesid just sigala töötajatelt.



Joonis 7. Antibiootikumresistentsete bakterite levik roojaproovides gruppide kaupa. (Grupp I – koduloomata inimesed, grupp II – koeraomanikud, grupp III – sigala töötajad).

Chapin ja kaastöötajad (2005, USA) uurisid sigalast võetud õhuproove. Isolaatidest 34% moodustasid enterokokid, 33% viridans grupi streptokokid, 32% koagulaas-negatiivsed stafülokokid. Märkimisväärne oli see, et 98% kõikidest isolaatidest olid resistentsed vähemalt kahele, 93% vähemalt kolmele sigalas kasutatavatele antibiootikumidele. Üksi bakter ei olnud aga resistentne vankomütsiinile, mida Ameerika Ühendriikides pole kunagi lubatud kasutada kariloomadel.

ESBL-i tootev enterobakter leiti 17% (5/29) sigala töötajatest, 8% (1/12) loomadega mittekokkupuutuvatel inimestel ning 2% (2/95) koeraomanike roojaproovidest (joonis 7). Sigala töötajatel esines oluliselt sagedamini roojas ESBL-tootev enterobakter kui koeraomanikel (5/29 vs 2/97; $p=0.008$). 2012. aastal Hollandis läbi viidud uuringus (Dohmen jt., 2012) leiti ESBL geene üle pooltest sigalafarmidest. Kokku uuritud 141 farmeritel, nende pereliikmetel ja töötajatel leiti 9% ESBL geene. Löhr ja kaastöötajad (2013) uurisid ESBL-tootvate enterobakterite püsivust inimeste roojas. Nad jälgisid imikuid ja leidsid, et keskmine ESBL-tootvate tüvede kandluse aeg pärast haiglast väljakirjutamist oli 12,5 kuud. Nad leidsid ka ESBL ülekandumist imikutelt teistele pereliikmetele (9/28; 32%). Keskmine ESBL-kandlus nende imikute vanemate seas oli 2,5 kuud. ESBL-kandlus iseenesest ohtu ei kujuta, probleem võib tekkida siis, kui immuunsüsteem nõrgeneb.

Mitmed uurimused on juba paari aastakümne eest kinnitanud MRSA transmissiooni meditsiinitöötajate, patsientide, nende perekonnaliikmete ja koerte vahel (Scott jt., 1988; Cefai jt., 1994; Simoons-Smit jt., 1997; Manian, 2003).

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida potentsiaalsete patogeenide ja antibiootikumresistentsete bakterite leidumist tervete inimeste mikrobiotas ning kas kokkupuude koertega või töötamine sigalas võib mõjutada mikrobiota koosseisu. Teema on oluline seoses infektsioonitekitajate antibiootikumresistentsuse olulise kasvuga viimastel aastatel käsitledes võimalikke resistentsuse levikuteid.

Kokku uuriti 284 inimese mikrobioloogilisi külve. Uuritavateks olid ilma koduloomata inimesed, koeraomanikud ja sigalatöötajad. Uuringuks tehti külvid ninakaapest (potentsiaalsete patogeenide, antibiootikumresistentsete mikroobide ning *Pseudomonas aeruginosa* määramiseks) ja roojaproovist (antibiootikumresistentsete mikroobide ning *Pseudomonas aeruginosa* leidmiseks). Bakterite identifitseerimiseks kasutati iseloomulikku kasvu diferentsiaalsöötmetel ja massispektromeetriat (MALDI-TOF).

Ninakülvidest leiti kõige rohkem gram-positiivseid baktereid, mikroobiliikidest esinesid sagedaimini *Staphylococcus epidermidis* ja *Staphylococcus aureus*. Gruppide võrdluses leiti sagedamini gram-positiivseid baktereid koeraomanikel. Sigalatöötajatel leiti oluliselt rohkem gram-negatiivseid baktereid kui loomadega mittekokkupuutuvatel inimestel ja koeraomanikel. Kuna sigala keskkond kujutab endast gram-negatiivsete bakterite allikat, on võimalik, et sigalas töötades suureneb mikrobiotas esinevate gram-negatiivsete bakterite hulk. Normaalses mikrobiotas harva esinevat potentsiaalset patogeeni *Pseudomonas aeruginosa* leiti kokku neljal inimesel, kõigil juhtudel oli tegemist koeraomanikega. Roojaproovidest leiti antibiootikumresistentseid baktereid 6,5% uuritustest, kõige enam sigala töötajatel. Arvestuslikult igal viiendal sigalatöötajal leidis resistentne bakteritüvi. Resistentsete mikroobide suurt osakaalu võib seostada antibiootikumide laialdase kasutamisega põllumajanduses, mis viib keskkonna mikroobide resistentsuse suurenemisele.

Käesoleva uurimuse tulemusel selgus võimalik seos normaalse mikrobiota koosseisu ja antibiootikumresistentsuse vahel seoses koduloomade pidamisega.

Kuna antud töös kasutatud proovid olid osa suuremast uurimusest (projektist ABRESIST), on järgmises etapis võimalik kasutada suuremat uuritavate arvu, mis tagaks usaldusväärsemad tulemused. Samuti võiks uurida vanuse, soo, antibiootikumravi ning muude kõrvaltegurite mõju potentsiaalsete patogeenide esinemisele ja nende antibiootikumresistentsusele inimese mikrobiotas.

SUMMARY

Potential pathogens and antibiotic resistance in healthy human microbiota and in connection with animal husbandry

Kati Kuld

Normal human microflora i.e. microbiota is a mixture of organisms found on healthy human skin and mucous membranes. Many bacteria in the normal microbiota are pathogens, which cause infection when the immune system is weakened. Extensive use of antibiotics in medicine and in agriculture causes the spread of antibiotic resistant bacteria in people as well as in animals. In this thesis staphylococci (MRSA), enterococci (VRE), enterobacteria (ESBL) and pseudomonads were studied more thoroughly.

The object of this thesis was to find potential pathogens and antibiotic resistant bacteria in the microbiota of healthy people and whether the composition of microbiota may be influenced by contact with animals (dogs and pigs). This topic is important because antibiotic resistance on pathogens has grown substantially in the recent years.

In all, 284 microbiological samples from people were studied. People were divided into three groups: people without animals, dog owners and workers in a pig farm. The screening of potential pathogens was made by culturing nasal samples (to determine the occurrence of potential pathogens, antibiotic resistant bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*) and faeces samples (to find antibiotic resistant bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*). For identification of bacteria, mass-spectrometry (MALDI-TOF) and characteristic growth in differential medium was used.

Gram-positive bacteria were found mostly from nasal cultures; the most frequent bacterial species were *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. While comparing different groups, there were more gram-positive bacteria found from dog owners. More gram-negative bacteria were found from workers in pig farms than from people who do not have contact with animals. Pig farms are the potential source of gram-negative bacteria, so it is possible that workers in pig farms have more gram-negative bacteria in their microbiota. Potential pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, which rarely occurs in healthy human microbiota, was found from four people and all of them were dog owners. 6.5% of antibiotic resistant bacteria were found from fecal samples, most of them from workers in pig farms. Every fifth worker in pig-farming had resistant bacterial strain. High amount of resistant

bacteria may be in relation with wide antibiotic usage in agriculture which leads to increase in resistant microbes in the environment.

The results of this thesis showed a possible association between normal human microbiota and antibiotic resistance with animal husbandry.

This study was a part of a bigger research (ABRESIST), the next step could be to use a greater amount of samples to get more reliable results. The influence of age, gender, earlier antibiotic treatment and other co-factors to the presence of potential pathogens and their antibiotic resistance in human microbiota can also be studied.

KIRJANDUSE LOETELU

- Azad, M. B., Konya, T., Maughan, H., Guttman, D. S., Field, C. J., Sears, M. R., Becker, A. B., Scott, J. A., Kozyrskyj, A. L. 2013. Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*; 9(1): 15.
- Bidet, P., Burghoffer, B., Gautier, V., Brahimi, N., Mariani-Kurkdjian, P., El-Ghoneimi, A., Bingen, E., Arlet, G. 2005. In vivo transfer of plasmid-encoded ACC-1 AmpC from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in an infant and selection of impermeability to imipenem in *K. pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 49(8): 3562–3565.
- Bogaard, A. E., Stobberingh, E. E. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 14: 327–335.
- Cavaco, L. M., Abatih, E., Aarestrup, F. M., Guardabassi, L. 2008. Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 52(10): 3612–3616.
- Cefai, C., Ashurst, S., Owens, C. 1994. Human carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* linked with pet dog. *Lancet*; 344(8921): 539-540.
- Chapin, A., Rule, A., Gibson, K., Buckley, T., Schwab, K. 2005. Airborne Multi-drug Resistant Bacteria Isolated from a Concentrated Swine Feeding operation. *Environmental Health Perspectives*; 113(2): 137-142.
- Costa, P. M., Loureiro, L., Matos, A. J. F. 2013. Transfer on multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*; 10: 278-294.
- Dohmen, W., Bos, M. E. H., Borlée, F., Cohen Stuart, J., Van Marm, S., Voskuil, S., Wagenaar, J. A., Bonten, M. J. M., Heederik, D. J. J. 2012. ESBLs in pig farming in the Netherlands. *International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics*; 4: 354
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 107(26): 11971-5.
- Ege, M. J., Mayer, M., Schwaiger, K., Mattes, J., Pershagen, G., van Hage, M., Scheynius, A., Bauer, J., von Mutius, E. 2012. Environmental bacteria and childhood asthma. *Allergy*; 67(12): 1565-1571.

- Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., Wieler, L. H. 2012. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical Microbiology and Infection*; 18(7): 646–655.
- Fisher, K., Philips, C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*; 155(6): 1749-1757.
- Fraser, S. L., Arnett, M., Sinave, C. P. 2013. *Enterobacter Infections. Practice Essentials.* Medscape Reference. Drugs, Diseases & Procedures.
- Furet, J. P., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., Doré, J., Corthier, G. 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiology Ecology*; 68(3): 351–362.
- Hadina, S., Pinter, L., Uhitil, S., Vučemilo, M., Jakšić, S. 2009. The assessment of gram-negative bacteria in the air of two swine nursery buildings. *Veterinarski Arhiv*; 79 (3): 219-227.
- Heederik, D., Brouwer, R., Biersteker, K., Boleij, J. S. M. 1991. Relationship of airborne endotoxin and bacteria levels in pig farms with the lung function and respiratory symptoms of farmers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*; 62(8): 595-601.
- Jacobsen, S. M., Shirliff, M. E. 2011. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Virulence*; 2(5): 460-465.
- Karlowsky, J. A., Jones, M. E., Draghi, D. C., Thornsberry, C., Sahm, D. F., Volturo, G. A. 2004. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*; 3: 7.
- Kasper, D. L., Fauci, A. S. 2010. *S. Aureus Infections*, p. 386. *Enterococci and Nonenterococcal Group D Streptococci*, p. 409-410. *In Harrison's Infectious Diseases*, 17th ed. The McGraw-Hill Companies, New York.
- Koh, A. Y., Priebe, G. P., Pier, G. B. 2005. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a Murine Model of Gastrointestinal Colonization and Dissemination in Neutropenia. *Infection and Immunity*; 73(4): 2262-2272.
- Lester, C. H., Frimodt-Møller, N., Sørensen, T. L., Monnet, D. L., Hammerum, A. M. 2006. In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 50(2): 596–599.

- Līduma, I., Tračevska, T., Bērs, U., Žileviča, A. 2012. Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Medicina (Kaunas)*; 48(6): 305-9.
- Löhr, I. H., Rettedal, S., Natås, O. B., Naseer, U., Oymar, K., Sundsfjord, A. 2013. Long-term faecal carriage in infants and intra-household transmission of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* following a nosocomial outbreak. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 68(5): 1043-1048.
- Madappa, T., Go, C. H. U. 2012. *Escherichia Coli Infections*. Medscape Reference. Drugs, Diseases & Procedures.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. 2006. Pathogenic *Pseudomonads*, p. 347. *Staphylococcus and Micrococcus*, p. 374. *Antibiotic-Resistant Pathogens*, p. 696. *Staphylococcus*, p. 864-865. *In Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed. Pearson Education International, USA.
- Malik, S., Christensen, H., Peng, H., Barton, M. D. 2007. Presence and diversity of the beta-lactamase gene in cat and dog staphylococci. *Veterinary Microbiology*; 123(1-3): 162-168.
- Manian, F. A. 2003. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. *Clinical Infectious Diseases*; 36(2): e26-28.
- Marshall, B. M., Levy, S. B. 2011. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*; 24(4): 718-733.
- Menichetti, F., Tagliaferri, E. 2012. Antimicrobial resistance in internal medicine wards. *International Journal of Emergency Medicine*; 7(3): 271-281.
- Mikelsaar, M., Karki, T., Lutsar, I., Mändar, R. 2006. Mikrofloora, lk 99-101. Antibakteriaalsed preparaadid lk 112-129. Infektsioon ja selle patogenees lk 131-135. *Meditiiniline mikrobioloogia I osa, teine trükk*. Tartu Ülikooli Kirjastus.
- Oh, J., Conlan, S., Polley, E. C., Segre, J. A., Kong, H. H. 2012. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. *Genome Medicine*; 4(10): 77.
- Parm, Ü. 1995. Nakkuse ülekande- ehk levikuteed, lk 16-17. *Hospitaalninfektsioon. Õpik keskmehitsiini personalile*. HK Trükikoda 11, Tallinn.
- Reid, G., Younes, J. A., Van der Mei, H. C., Gloor, G. B., Knight, R., Busscher, H. J. 2011. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nature Reviews Microbiology*; 9(1): 27-38.
- Saeidi, N., Wong, C.K., Lo, T.M., Nguyen, H.X., Ling, H., Leong, S.S., Poh, C.L., Chang, M.W. 2011. Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen. *Molecular Systems Biology*; 7: 521.
- Sapkota, A. R., Curriero, F. C., Gibson, K. E., Schwab K. J. 2007. Antibiotic-Resistant Enterococci and Fecal Indicators in Surface Water and Groundwater Impacted by a

- Concentrated Swine Feeding Operation. *Environmental Health Perspectives*; 115(7): 1040-1045.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Walsh, T. R. 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 17(6): 431–437.
- Scott, J. M., Thomson, R., Malonelee, J., Ridgway G. L. 1988. Cross infection between animals and man – possible feline transmission of *Staphylococcus aureus* infection in humans. *Journal of Hospital Infection*; 12(1): 29-34.
- Simoons-Smit, A. M., Savelkoul, P. H. M., Stoof, J., Starink, T. M., Vandenbroucke-Grauls, C.M. 1997. Transmission of *Staphylococcus aureus* between humans and domestic animals. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*; 19(2): 150-152.
- Song, S. J., Lauber, C., Costello, E. K., Lozupone, C. A., Humphrey, G., Berg-Lyons, D., Caporaso, J. G., Knights, D., Clemente, J. C., Nakielnny, S., Gordon, J. I., Fierer, N., Knight, R. 2013. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *eLife*; 2: e00458.
- Struble, K., Stuart Bronze, M., Jackson, R. L., Gonzalez, G. 2013. *Proteus* Infections. Medscape Reference. Drugs, Diseases & Procedures.
- Suchodolski, J. S. 2011. Intestinal Microbiota of Dogs and Cats: a Bigger World than We Thought. *The Veterinary Clinics of North America. Small animal practice*; 41(2): 261–272.
- Ziebuhr, W. 2001. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: Emerging Pathogens in Nosocomial Infections. *Contributions to Microbiology*; 8: 102-107.
- Tuohy, K., Davies, M., Rumsby, P., Rumney, C., Adams, M. R., Rowland, I. R. 2002. Monitoring transfer of recombinant and nonrecombinant plasmids between *Lactococcus lactis* strains and members of the human gastrointestinal microbiota in vivo - Impact of donor cell number and diet. *Journal of Applied Microbiology*; 93(6): 954–964.
- Wertheim, H. F., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A., Nouwen, J. L. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases*; 5(12): 751-762.
- WHO Europe. Complacency kills. Antibiotic resistance still on the rise in Europe. WHO raises the alert on World Health Day. Copenhagen, 7 April 2011.
- Wos-Oxley, M. L., Plumeier, I., von Eiff, C., Taudien, S., Platzer, M., Vilchez-Vargas, R., Becker, K., Pieper, D. H. 2010. A poke into the diversity and associations within human anterior nares microbial communities. *The ISME Journal*; 4(7): 839-851.

KASUTATUDVEEBIAADDRESSID

Todar's Online Textbook of Bacteriology. Kenneth Todar

<http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html>

<http://textbookofbacteriology.net/images/P.aeruginosa.colonies.jpg>

<http://textbookofbacteriology.net/NHPR.html>

<http://textbookofbacteriology.net/normalflora.html>

<http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>

<http://textbookofbacteriology.net/staph.html>

Microbiology online

<http://www.microbiologyonline.org.uk/about-microbiology/microbes-and-the-human-body/routes-of-transmission>

FACTSHEET: Antibiotic Resistance and Animal Agriculture

<http://www.keepantibioticsworking.com/library/UploadedFiles/ABR-UCS-fact-sheet.pdf>

Australian Broadcasting Corporation. Nonee Walsh, Ailsa McManus

<http://www.abc.net.au/science/slab/antibiotics/resistance.htm>

MALDI-TOF MS ja selle rakendamise kaasaegses mikrobioloogias. Aleksei Nelovkov. 2011

<http://www.elmy.ee/public/files/MALDI-TOF%20Mikrobioloogias%20-%202008-12-2011.pdf>

Pildid

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v1.3_pdf.pdf

<http://www.oxid.com/CA/blue/press/press.asp?art=Y&arch=Y&pRef=CADENIM07&c=CA&lang=EN&yr=2005>

LISAD

Lisa 1. Söötmete koostised

Veriagar (Oxoid): 1% „LabLemco“ puljongipulber (Oxoid), 1% peptoon, 0,5% NaCl, 1,5% agar, 5% defibrineeritud hobuseveri.

Brilliance™ ESBL Agar (Oxoid).

| Koostis | Hulk (g/l) |
|------------------------|------------|
| Peptoon | 15,0 |
| Agar | 12,0 |
| Naatriumkloriid (NaCl) | 5,0 |
| Fosfaatpuhver | 4,0 |
| Kromogenne segu | 4,0 |
| Antibiootikumide segu | 0,28 |

Kasvu iseloomustus: *Escherichia coli* - sinised või roosad kolooniad; *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* ja *Citrobacter* - rohelised kolooniad; *Proteus*, *Morganella* ja *Providencia* pruuni haloga.

Brilliance™ MRSA (Oxoid).

| Koostis | Hulk (g/l) |
|-----------------------|------------|
| Peptoonisegu | 25,0 |
| Soolade segu | 25,0 |
| Agar | 15,0 |
| Kaoliin | 13,0 |
| Kromogenne segu | 2,0 |
| Antibiootikumide segu | 4 ml |

pH 7,3 ± 0,225°C juures

Kasvu iseloomustus: *Staphylococcus aureus* – sinised kolooniad.

Brilliance™ VRE (Oxoid).

| Koostis | Hulk (g/l) |
|--------------|------------|
| Peptoonisegu | 25,0 |
| Agar | 12,5 |

| | |
|------------------------------------|------|
| Soolade segu | 12,0 |
| Titaandioksiid (TiO ₂) | 1,0 |
| Kromogenne segu | 0,45 |
| Antibiootikumide segu | 5 ml |

pH 6,5 ± 0,225°C juures

Kasvu iseloomustus: *Enetrococcus faecalis* – helesinised kolooniad; *Enetrococcus faecium* – sinakaslillad kolooniad.

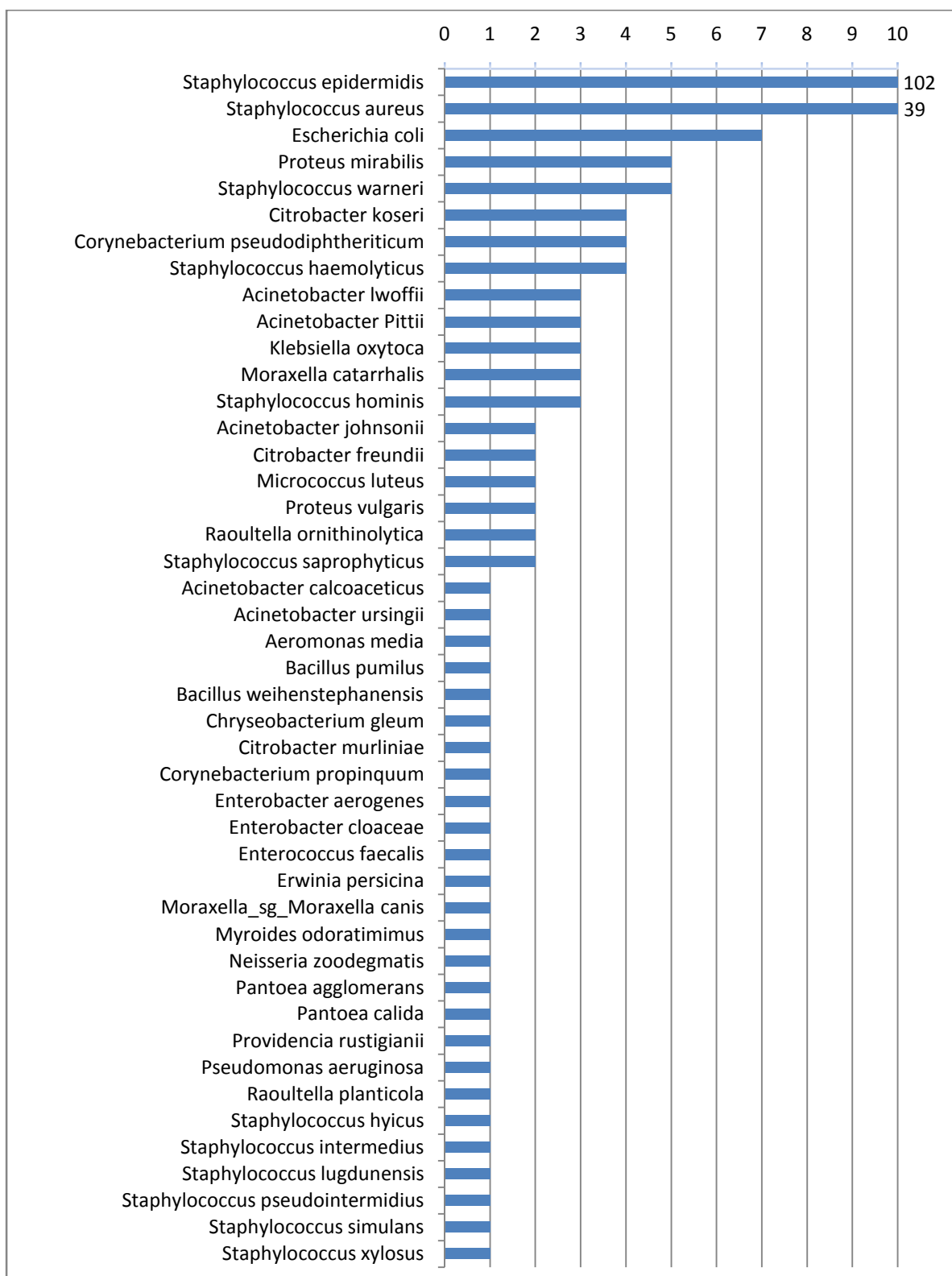
Pseudomonas isolation agar (Sigma-Aldrich).

| Koostis | Hulk (g/l) |
|--|------------|
| Peptoonisegu | 20,0 |
| Agar | 13,6 |
| Kaaliumsulfaat (K ₂ SO ₄) | 10,0 |
| Magneesiumkloriid (MgCl) | 1,4 |
| Triklosaan | 0,025 |

pH 7,0 ± 0,237°C juures

Kasvu iseloomustus: *Pseudomonas aeruginosa* – rohelised või sinised kolooniad.

Lisa 2. Bakteriliikide arvukus



Bakteriliikide arvukus toodud sageduse järjestuses. Kokku leiti 223 bakterit, *S. epidermidis*'t 102, *S. aureus*'t 39, ülejäänud baktereid tuvastati alla 10.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada eelkõige oma juhendajat Siiri Kõljalta suure abi eest käesoleva töö valmimisel. Suur aitäh ka Kaidi Tellingule ning teistele töögrupi liikmetele, kellega koos tööks vajalikud katsed teostati. Tänan oma kaasjuhendajat Jekaterina Jutkinat praktiliste näpunäidete eest.

Töös kasutatud andmestiku kogumist toetas Euroopa Liidu Regionaalarengu Fond läbi TerVE programmi projekti ABRESIST.

LIHTLITSENTS

Mina Kati Kuld

(sünnikuupäev: 21.04.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Potentsiaalsed haigustekitajad ja nende antibiootikumresistentsus tervete inimeste
mikrobiotas ning seos koduloomadega pidamisega,

mille juhendaja on Siiri Kõljalg ja kaasjuhendaja Jekaterina Jutkina,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil,
sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse
tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas
digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2013